

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
Direktor: Professor Dr. med. Hans-Joachim Dulce

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LÖSLICHKEIT DES HYDROXYLAPATITS

Ein Beitrag zur Frage der Cariesgenese

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. med. dent. Maria Hardel, geb. Lehmann
aus Markkleeberg

1972

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz
Direktor: Professor Dr. med. Hans-Joachim Dulce

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LÖSLICHKEIT DES HYDROXYLAPATITS

Ein Beitrag zur Frage der Cariesgenese

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. med. dent. Maria Hardel, geb. Lehmann
aus Markkleeberg

Referent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Dulce

Korreferent: Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19. 1. 1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	5
2. <u>UNTERSUCHUNGEN ZU DER CHEMISCH-PARASITÄREN</u> <u>HYPOTHESE VON MILLER</u>	6
2.1. Herstellung der Proben	7
2.1.1. in vitro-Versuche	7
2.1.2. in vivo-Versuche	8
2.2. Untersuchungsmethoden	9
2.2.1. pH-Messung	9
2.2.2. Komplexometrische Bestimmung des Gesamtcalciums	9
2.2.3. Direkte Messung des ionisierten Calciums mit einer Calciumionen- Aktivitätselektrode	9
3. <u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	13
3.1. Die Calciumionen-Aktivität im Löslich- keitsgleichgewicht zwischen dem Apatit des Zahnschmelzes und dem Speichel	13
4. <u>UNTERSUCHUNGEN ZU DER PROTEOLYSE-CHELATEBIL-</u> <u>DUNGS-HYPOTHESE VON SCHATZ</u>	15
4.1. Definition von Metallchelatverbindungen	15
4.2. Untersuchungsmethode	18
4.2.1. Potentiometrische Bestimmung der Stabilitätskonstanten von Cal- cium-Aminosäure-Chelat-Komplexen	18
4.3. Versuchsanordnung	20

4.3.1. Berechnung der Stabilitäts- konstanten	23
5. <u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	28
5.1. Berechnung der als Aminosäure-Chelate löslichen Zahnhartsubstanz	28
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	31
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	33

1. EINLEITUNG

Die Ätiologie der Caries ist zur Zeit ungeklärt.

Unterschiedliche Hypothesen über den Mechanismus der Caries-entstehung wurden postuliert.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Hypothesen herausgegriffen, die großen Einfluß auf die Cariesforschung haben, und auf ihre Gültigkeit untersucht:

1. die chemisch-parasitäre Hypothese von MILLER^(1,2),
2. die Proteolyse-Chelatbildungs-Hypothese von SCHATZ⁽³⁻⁹⁾.

MILLER beschreibt in seiner chemisch-parasitären Hypothese den Angriff von säurebildenden Bakterien der Mundhöhle auf den Zahnschmelz. Entscheidend ist die Entstehung von H^+ -Ionen, das heißt, es handelt sich um eine Auflösung der Zahnhartsubstanz im sauren Milieu. Chemisch ist dieser Vorgang erklärbar: Der mineralische Anteil des Zahnschmelzes besteht wie der des Dentins und der des Knochens im wesentlichen aus Hydroxylapatit $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, der im Schmelz in den Schmelzprismen angeordnet ist. Diese Schmelzprismen stellen aber nicht etwa Einkristalle dar, sondern sind wiederum aus kleinen, homogenen Kristalliten aufgebaut. Die Schmelzprismen sind voneinander durch die organische interprismatische Substanz getrennt. Der Schmelz ist also bezüglich seines Aufbaues heterogen, was zwar für seine mechanischen Eigenschaften wertvoll, für seine Resistenz gegen chemische Einflüsse aber nachteilig ist. Eine heterogene Schmelzoberfläche ist gegenüber den verschiedenartigen Korrosionsangriffen in der Mundhöhle besonders stark anfällig. So ist aus in vitro-Versuchen von LEVINSKAS und NEUMAN⁽¹⁰⁾ und von ERICSSON⁽¹¹⁾ bekannt, daß sich sowohl synthetischer Hydroxylapatit als auch Zahnschmelz in Abhängigkeit vom pH-Wert lösen. Die Proteolyse-Chelatbildungs-Theorie von

SCHATZ⁽³⁻⁹⁾ macht die Bildung von löslichen Calciumchelaten für das Zustandekommen der Caries verantwortlich. Die Komplexbildner, vor allem Aminosäuren, sollen bei der Proteolyse durch keratinolytische Mundbakterien entstehen. Andere Autoren, wie WANDEL⁽¹²⁾ und EGGERS-LURA⁽¹³⁾, vertreten die Ansicht, daß die im Speichel vorhandenen Aminosäuren als Komplexbildner in Frage kommen. Nach dieser Hypothese ist die Proteolyse notwendigerweise mit Chelatbildung verbunden, das heißt, organische Matrix und Schmelzapatit würden mehr oder weniger gleichzeitig zerstört. Die Hypothese dieses Mechanismus der Cariesentstehung nach SCHATZ wurde deshalb als Proteolyse-Chelatbildung bezeichnet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden überprüft:

1. die Berechtigung der MILLERschen Hypothese durch Messung der Calciumionen-Aktivität im quasistationären Löslichkeitsgleichgewicht zwischen dem Apatit des Zahnschmelzes und dem Speichel,
2. die Berechtigung der SCHATZschen Hypothese durch Messung der Stabilitätskonstanten von Calcium-Aminosäure-Chelatkomplexen und durch die Berechnung der als Aminosäure-Chelate löslichen Zahnhartsubstanz.

2. UNTERSUCHUNGEN ZU DER CHEMISCH-PARASITÄREN HYPOTHESE

VON MILLER

Es ist bekannt, daß sich synthetischer Hydroxylapatit und der Hydroxylapatit der Zahnhartsubstanz ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) in Abhängigkeit vom pH-Wert lösen (LEVINSKAS und NEUMAN⁽¹⁰⁾ ERICSSON⁽¹¹⁾). Die Masse des in Lösung gehenden Calciums ist von der H^+ -Ionen-Konzentration abhängig, so daß mit ansteigender Acidität die Löslichkeit zunimmt. Die Vertreter der MILLERschen Hypothese diskutieren ausschließlich die Löslichkeit der Zahnhartsubstanz. Es muß aber neben

dieser Löslichkeit der Zahnhartsubstanz der diese Löslichkeit kompensierende Einfluß des Speichels mit seinem Mineralgehalt berücksichtigt werden, denn der Zahn ist unter in vivo-Bedingungen ständig von diesem Milieu umgeben.

Deshalb wird von uns die Hypothese aufgestellt - wie DULCE und HARDEL⁽¹⁴⁾ bereits vorläufig berichtet haben -, daß ein Löslichkeitsgleichgewicht zwischen dem Apatit des Zahnschmelzes und dem Speichel besteht. Wir prüften diese Arbeitshypothese durch Messung der pH-Abhängigkeit der Calciumionen-Aktivität, und zwar einmal im Pahmen von Löslichkeitsversuchen an Zahnschmelz, zum anderen im Speichel.

2.1. Herstellung der Proben

2.1.1. in vitro-Versuche

Bei menschlichen Zähnen, die in einem Gemisch aus 15 Vol.-% Glycerin, 60 Vol.-% 95%igem Alkohol und 25 Vol.-% Aqua dest. aufbewahrt worden waren, erfolgte die Trennung von Schmelz und Dentin durch Schleifen mit Diamantscheiben. Für die Versuche wurde nur der pulverförmige Zahnschmelz eingesetzt. Das Pulver wurde ca. 12 Stunden bei 105 °C getrocknet. Für die Löslichkeitsversuche wurden jeweils 0,25 g Schmelz in 125 ml Pufferlösung mit einem Zusatz von 0,5 ml Chloroform p.a. zur Verhütung von Bakterienwachstum in Polyäthylen-Flaschen 40 Tage bei 25 °C geschüttelt. Als Pufferlösungen wurden Natriumcacodylat-Puffer (GOMORI⁽¹⁵⁾, PLUMEL⁽¹⁶⁾) für den pH-Bereich von 5,0 - 7,0, Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (GOMORI⁽¹⁷⁾) für den pH-Bereich von 7,2 - 7,4 benutzt. Die Pufferlösungen wurden mit calciumfreiem Aqua dest. hergestellt. Es wurden jeweils 10 Proben bei pH-Werten von 5,0, 5,9, 6,2, 6,4, 6,5, 6,8, 7,0, 7,2 und 7,4 angesetzt.

Durch Analyse der pH-Titrationskurven nach SCHWARZENBACH

und Mitarb. (18,19) wurde ermittelt, daß sowohl Caco-dylat- als auch Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer keine Chelatkomplexe mit Calcium bildet. Nach Ablauf der Schüttelzeit und einstündigem Zentrifugieren in Poly-äthylen-Zentrifugenbechern bei 1700 Upm wurde der pH-Wert der Lösung gemessen.

Es zeigte sich, daß der pH-Wert während der Zeit des Schüttelns konstant geblieben war. In der Lösung wurden Gesamtcalcium und ionisiertes Calcium bestimmt.

2.1.2. in vivo-Versuche

Uns standen 160 Versuchspersonen zur Verfügung. Um möglichst ein vergleichbares Probandengut zu haben, wählten wir junge Männer mit unterschiedlichem Gebißbefund im Alter von 18 - 24 Jahren aus. Von jeder Versuchsperson wurden 5 - 10 ml Ruhespeichel in Duran-Gläsern gesammelt. Leerwertbestimmungen zeigten, daß kein Calcium aus den Duran-Gläsern freigesetzt wurde. Die Speichelproben wurden sofort im Platin-Tiegel mit rauchender Salpetersäure abgeraucht und der Rückstand zur Zersetzung der Nitrate einige Zeit auf schwache Rotglut erhitzt. Die Operation wurde mehrfach wiederholt. Das Produkt ließ sich mit 1 n HCl und mit 5 ml calciumfreiem Aqua dest. rückstandsfrei lösen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer Umsetzung mit HCl liegt darin, daß sämtliche organischen Bestandteile völlig oxydiert werden. Das Verfahren ermöglicht die Messung des Gesamtcalciums. Zur Bestimmung der Calciumionen-Aktivität und des pH-Wertes im Speichel ließen wir die Versuchspersonen unmittelbar vor den Messungen ca. 0,5 - 1,0 ml Ruhespeichel in Mikroprobenschälchen speien. Die CO₂-Verluste waren vernachlässigbar klein, weil Kontrolluntersuchungen des pH-Wertes keine pH-Änderungen ergaben.

2.2. Untersuchungsmethoden

2.2.1. pH-Messung

Die pH-Werte wurden mit der Mikroglaselektrode E 5021a der Firma Radiometer, Copenhagen, gemessen. Die Meßkette haben wir mit Fixanalphufferlösungen (Merck) geeicht und diese Eichung in gewissen Zeitabständen überprüft. Unter diesen Bedingungen lag die Reproduzierbarkeit unserer Messungen bei 0,02 pH-Einheiten.

2.2.2. Komplexometrische Bestimmung des Gesamtcalciums

Die Bestimmung des Gesamtcalciums erfolgte nach der von SCHWARZENBACH und Mitarb.⁽²⁰⁾ angegebenen und von QUICKER und DULCE⁽²¹⁾ weiterentwickelten Methode mit Äthylendiamintetraessigsäure (AeDTA) und Murexid. Zur Titration benutzten wir eine automatische Apparatur der Firma Radiometer, Copenhagen, mit automatischer Bürette, Photometer und angeschlossenen Schreiber. Die Gesamtcalcium-Konzentration ergab sich aus den verbrauchten AeDTA-Volumina (SCHWARZENBACH⁽²²⁾). Die Analysenergebnisse wurden mit Hilfe von CaCO_3 -Eichlösungen verschiedener Konzentrationen korrigiert. Für alle Analysen wurde calciumfreies Aqua dest. verwendet.

2.2.3. Direkte Messung des ionisierten Calciums mit einer Calciumionen-Aktivitätselektrode

Eine direkte Messung der Aktivität von ionisiertem Calcium wurde durch die Calcium-Elektrode 92-20 der Firma Orion Research Inc., Cambridge, Mass., möglich. Die Elektrode arbeitet nach dem Ionenaustauscher-Prinzip. Das Potential wird entlang einer dünnen Schicht eines wasserabstoßenden Ionenaustauschers gebildet, der sich innerhalb einer inerten, porösen Membran befindet (Abb. 1). Diese Membran

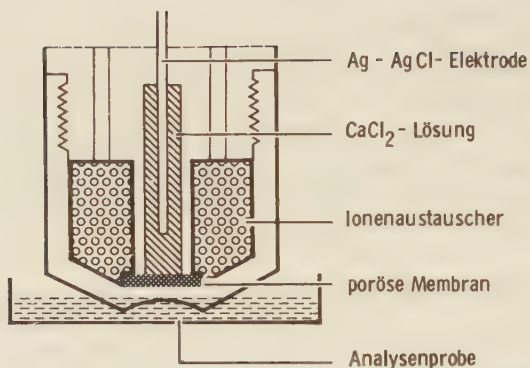


Abb. 1. Schematische Darstellung der Calciumionen-Aktivitätselektrode

begrenzt auch den Diffusionsweg der Calciumionen. Der Ionenaustauscher ist ein Calciumsalz einer organischen Phosphorsäure, die eine sehr hohe Spezifität für Calciumionen besitzt. Eine CaCl_2 -Lösung steht mit der Innenseite der porösen Membran in Verbindung. Die Calciumionen dieser Lösung gewährleisten ein stabiles Potential zwischen der Innenseite der Membran und der CaCl_2 -Lösung, während die Chloridionen ein stabiles Potential zwischen der Ag-AgCl-Elektrode und der CaCl_2 -Lösung herstellen. Eine Potentialänderung tritt somit nur auf, wenn sich die Calciumionen-Aktivität in der zu untersuchenden Lösung ändert.

Die Elektrode reagiert ausschließlich auf ionisiertes, nicht aber auf komplexgebundenes Calcium und folgt der NERNSTschen Gleichung bis zu einer Calciumionen-Aktivität von $1 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter in einem pH-Bereich von 5,5-11

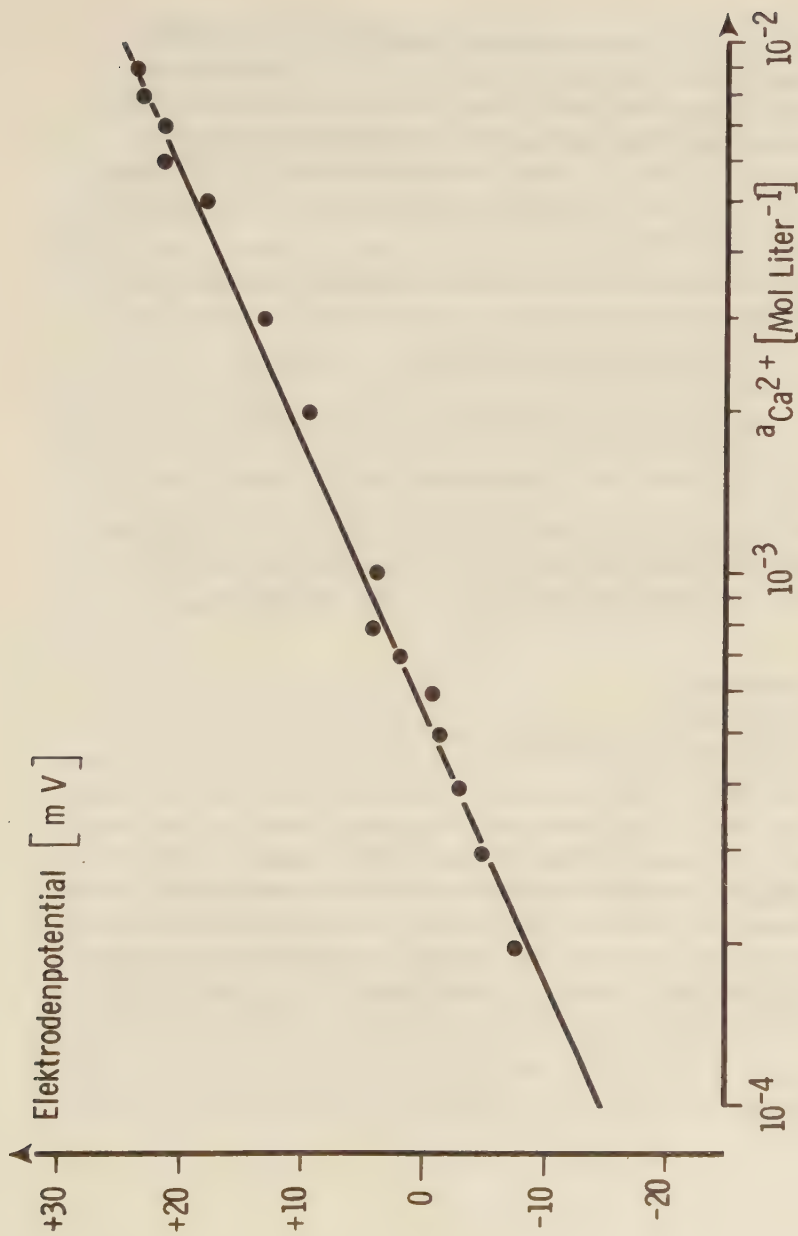


Abb. 2. Eichkurve der Calciumionen-Aktivitätsselektrode

(Abb. 2). Als Bezugselektrode wurde eine Kalomel-Elektrode benutzt. Das Elektrodenpotential in mV wurde mit einem pH-Meter mit gespreizter Skala der Firma Knick abgelesen. Die Calciumionen-Aktivitätselektrode wurde mehrmals täglich mit einer standardisierten CaCl_2 -Lösung geeicht, und zwar für einen Bereich von $1 \cdot 10^{-2}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ $a_{\text{Ca}^{2+}}$ Mol/Liter.

Die Abweichungen des Elektrodenpotentials betrugen bei Aktivitäten von

$$a_{\text{Ca}^{2+}} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ [Mol/Liter]} : \pm 1,5 \text{ [mV]}$$

$$a_{\text{Ca}^{2+}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ [Mol/Liter]} : \pm 2,5 \text{ [mV]}$$

$$a_{\text{Ca}^{2+}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ [Mol/Liter]} : \pm 3,5 \text{ [mV]}$$

Die gemessene Calciumionen-Aktivität ist von der Calciumionen-Konzentration sowie von der Ionenstärke und damit vom Aktivitätskoeffizienten der Lösung abhängig:

$$a = f c$$

Es bedeuten:

a = Aktivität

f = Aktivitätskoeffizient

c = Konzentration

Da es sich vor allem bei Speichel, aber auch bei dem Überstand der geschüttelten Schmelzproben um komplizierte Systeme mit weitgehend unübersichtlicher gegenseitiger Beeinflussung der Ionen handelt, kann die Ionenstärke dieser Lösungen kaum angegeben und deshalb der Aktivitätskoeffizient nicht ermittelt werden. Deshalb haben wir für die von uns untersuchten Lösungen in grober Näherung $f = 1$ und damit

$$a = c$$

gesetzt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Die Calciumionen-Aktivität im Löslichkeitsgleichgewicht zwischen dem Apatit des Zahnschmelzes und dem Speichel

Die Löslichkeitsmessungen von Zahnschmelz in Natriumcacylat- und Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer ergaben die in Abb. 3 wiedergegebene Abhängigkeit der Calciumionen-Aktivität vom pH-Wert. Die von uns gefundenen Analysenergebnisse korrespondieren im wesentlichen mit den Ergebnissen von LEVINSKAS und NEUMAN⁽¹⁰⁾ und ERICSSON⁽¹¹⁾. Völlig analoge Werte wurden für die Calciumionen-Aktivität des Speichels der 160 Versuchspersonen gefunden (Abb. 3). Die komplexometrisch bestimmte Gesamtcalcium-Konzentration im Speichel der Versuchspersonen betrug $10 \cdot 10^{-4}$ bis $22 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter; die Werte waren unabhängig vom pH-Wert. Der prozentuale Anteil α der Calciumionen-Aktivität an der Gesamtcalcium-Konzentration nimmt mit abnehmendem pH zu (Abb. 3).

Die Untersuchungen zeigen folgendes:

1. Die Aktivität der Calciumionen im Speichel ist ebenso groß wie die Calciumionen-Aktivität, die sich infolge der Löslichkeit der anorganischen Bestandteile des Zahnschmelzes einstellt. Das bedeutet, daß sich bei einem gegebenen pH-Wert die Auflösung der Zahnhartsubstanz und die Abscheidung aus dem Speichel kompensieren. Zwischen dem Apatit des Zahnschmelzes und dem Speichel besteht ein quasi-stationäres Löslichkeitsgleichgewicht.
2. Mit zunehmender Wasserstoffionen-Aktivität steigt zwar die Löslichkeit der anorganischen Komponenten des Zahnschmelzes, gleichzeitig aber nimmt der prozentuale Anteil α des ionisierten Calciums im Speichel zu, weil die Kom-

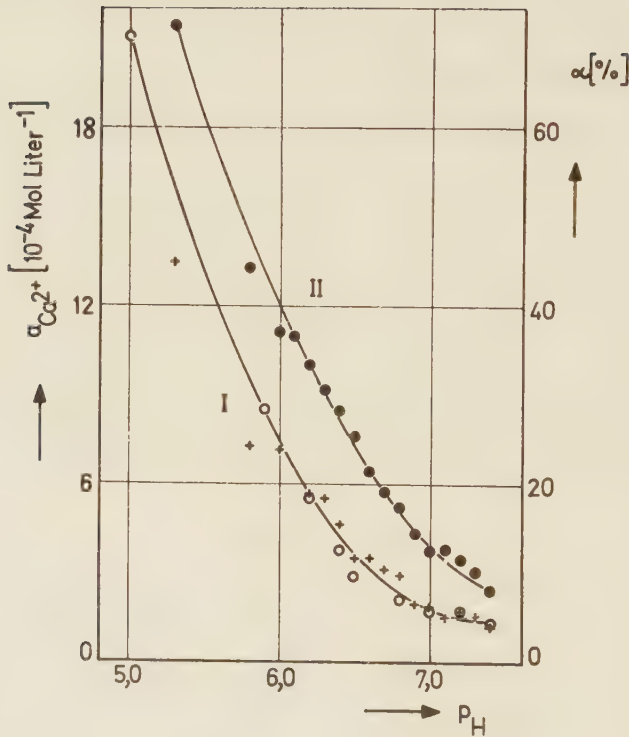


Abb. 3. Löslichkeit (Kurve I) von Zahnschmelz in Natrium-cacodylat- und Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer, Calciumionen-Aktivität (Kurve I) im Speichel und Verhältnis α (Kurve II) der Calciumionen-Aktivität zur Gesamtcalcium-Konzentration im Speichel. ○ Zahnschmelz, + Speichel, ● Speichel

plexbildung des Calciums mit abnehmendem pH-Wert vermindert wird. Auch bei einer Änderung des pH kompensieren sich Auflösung und Abscheidung der Zahnhartsubstanz, wie Abb. 3 zeigt. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß wir keine Korrelation zwischen der Cariesfrequenz der Versuchspersonen und der pH-abhängigen Calciumionen-Aktivität im Speichel dieser Versuchspersonen feststellen konnten.

Wir kommen zu dem Ergebnis, daß es nicht länger haltbar ist, ausschließlich die Löslichkeit der Zahnhartsubstanz zu diskutieren. Es muß vielmehr der diese Löslichkeit kompensierende Einfluß des Speichels in Betracht gezogen werden. Die Verhältnisse können vereinfachend durch folgendes Bild beschrieben werden:

Säuren, die auf Zahnschmelz einwirken und deren Komplexbildung mit Calcium klein ist, wie HARDEL⁽²³⁾ sowie HARDEL und DULCE⁽²⁴⁾ schon vorläufig berichteten, lösen zwar Calciumionen aus dem Zahnschmelz, gleichzeitig aber wird aus den Calciumkomplexen des Speichels eine äquivalente Menge an Calciumionen freigesetzt und abgeschieden.

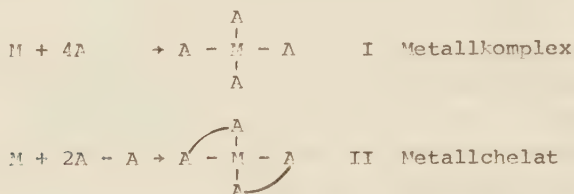
Die MILLERsche Hypothese der Cariesentstehung infolge Säurereinwirkung dürfte deshalb nicht aufrecht zu erhalten sein.

4. UNTERSUCHUNGEN ZU DER PROTEOLYSE-CHELATBILDUNGS- HYPOTHESE VON SCHATZ

4.1. Definition von Metallchelatverbindungen

Verbindet sich ein Metallion mit einem Elektronendonator, so bezeichnet man die dabei entstehende Substanz als Komplex oder Koordinationsverbindung (MARTELL und CALVIN⁽²⁵⁾). Enthält die mit dem Metallion reagierende Substanz zwei oder mehrere Gruppen mit Elektronendonatoreigenschaften,

so daß bei der Reaktion ein oder mehrere Ringe gebildet werden, wird die resultierende Molekel als eine Chelatverbindung bezeichnet. Die reagierende Substanz ist dann ein Chelatbildner (MORGAN und DEEW⁽²⁶⁾). Schematisch lassen sich Komplex- bzw. Chelatverbindungen wie folgt darstellen:



Darin sind M ein Metallion, A ein Komplexbildner und A - A ein Chelatbildner.

Komplexe und Chelate bilden fast alle Metalle des Periodensystems. Als Donatoratome, die die Bindung mit dem Metall eingehen, kommen nur die nichtmetallischen Elemente der Hauptgruppen V und VI in Betracht, überwiegend Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel. Die Chelatverbindungen kann man als eine gesonderte Klasse von Verbindungen mit charakteristischer Verhaltensweise betrachten. So haben die cyclischen Verbindungen, in welchen sich ein Metallion mit zwei oder mehr Donatorgruppen einer einzigen Molekel oder eines Ions verbinden, z.B. gegenüber einfachen Komplexen eine sehr viel höhere Stabilität. Die Löslichkeit von Innerkomplexsalzen (unpolare Chelate) in Wasser ist dann schwer möglich, wenn sie relativ wenige der Hydratisierung zugängliche Gruppen enthalten. Je weniger derartige Gruppen vorhanden sind, desto schwerer löslich wird das betreffende Chelat sein. Durch eine Vergrößerung der nichtsolvatisierten Molekelgruppen im Chelat wird dessen Löslichkeit herabgesetzt (FEIGL⁽²⁷⁾). Dieser Effekt

läßt den Einfluß der solvatisierten und der nichtsolvatisierten Molekelgruppen im Komplex auf dessen Löslichkeit erkennen. Je größer die Kohlenwasserstoffgruppen sind, desto geringer wird die Löslichkeit in Wasser, desto größer wird sie in weniger polaren Lösungsmitteln sein. Der Einfluß solcher Gruppen kann aber zumindest teilweise durch den Einbau stark hydrophiler Gruppen, z.B. Aminogruppen, in den organischen Grundkörper kompensiert werden. Das bedeutet also, daß Calcium-Aminosäure-Chelate aufgrund ihrer Aminogruppen in Wasser relativ leicht löslich sind. Diese Tatsache veranlaßte SCHATZ⁽³⁻⁹⁾ zu der Proteolyse-Chelatbildungs-Hypothese als möglichen Mechanismus der Cariesgenese, wobei Aminosäuren, die aus dem Speichel bzw. aus der cariesbedingten Proteolyse der Zahnmatrix stammen, für die Chelatbildung mit dem Calcium der Zahnhartsubstanz in Frage kommen sollen. Experimentell haben SCHATZ und MARTIN⁽²⁸⁾ eine etwas bessere Löslichkeit der Zahnhartsubstanz in basischen Serin- und Asparaginsäurelösungen gegenüber Wasser gefunden. Die SCHATZsche Hypothese wurde von BREUSTEDT⁽²⁹⁾ und EGGERS-LUNA⁽³⁰⁾ abgelehnt. So zeigten orientierende Versuche von BREUSTEDT⁽²⁹⁾, daß 0,1 bis 0,01 n Serinlösung zwischen pH 7 bis pH 9, verglichen mit Äthylendiamintetraessigsäurelösung gleicher Normalität, nur sehr geringe Mengen Calcium aus Zahnpulver freisetzt. Diese Ergebnisse lassen aber eine allgemeine Aussage noch nicht zu, weil sie sich nur auf eine einzige im Speichel vorkommende Aminosäure beziehen und zahlenmäßig nicht erfaßbar sind.

Deshalb wird im folgenden - HARDEL⁽²³⁾, HARDEL und DULON⁽²⁴⁾ berichteten schon kurz darüber -, die Berechtigung der Proteolyse-Chelatbildungs-Hypothese experimentell und rechnerisch überprüft. Man muß dazu die Konzentration der freien Aminosäuren im Speichel, die Dissoziationskonstanten der Aminosäuren, den pH-Wert des Speichels, die Calciumion-

nen-Aktivität im Speichel und die Stabilitätskonstanten der Calcium-Aminosäure-Chelate kennen.

4.2. Untersuchungsmethode

Die Konzentration der wichtigsten freien Aminosäuren ist aus der Literatur bekannt. Mit der von MOORE, SPACKMAN und STEIN⁽³¹⁾ angegebenen Methode der Ionenaustauscher-Chromatographie ermittelte FORNER⁽³²⁾ aus Parotisspeichel und Mischspeichel ca. 17 Aminosäuren.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich wird, beträgt die Konzentration einer einzelnen Aminosäure, sowohl im Misch- als auch im Parotisspeichel, ca. $1 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter, die der Summe aller Aminosäuren ca. $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter.

Von einigen dieser Aminosäuren, nämlich von Glycin, Alanin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin, sind die Stabilitätskonstanten mit Calcium bekannt (DAVIES und WALSH⁽³³⁾, LUMP und MARTELL⁽³⁴⁾).

Wir haben die Untersuchungen über die Stabilitätskonstanten von Calcium-Aminosäure-Chelat-Komplexen auf fast alle im Speichel und der Zahnmatrix vorkommenden Aminosäuren erweitert.

4.2.1. Potentiometrische Bestimmung der Stabilitätskonstanten von Calcium-Aminosäure-Chelat-Komplexen

Zur Bestimmung der Stabilitätskonstanten haben wir die Methode der potentiometrischen Messung der Wasserstoffionen-Konzentration angewandt.

Man kann sich die Bildung aller Metallchelate so vorstellen, daß ein oder mehrere Protonen des Chelatbildners durch ein Metallion verdrängt werden. So tritt beim Zu-

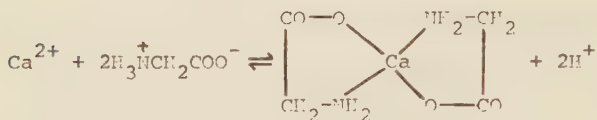
Tab. 1. Konzentration in $\mu\text{Mol/Liter}$ der freien Aminosäuren in Misch- und Parotissspeichel von 2 Versuchspersonen (nach BORNER⁽³²⁾)

Probe	Mischspeichel		Parotissspeichel	
Substanz	Versuchsperson		Versuchsperson	
	I	II	I	II
Asparaginsäure	6	12	11	13
Threonin	3	7	9	3
Serin + Glutamin	9	21	17	15
Glutaminsäure	5	8	22	23
Citrullin	-	+	+	3
Glycin	10	19	27	19
Alanin	4	7	8	3
Valin	-	2	17	+
Cystin	-	-	+	-
Methionin	-	-	+	-
Isoleucin	+	+	2	+
Leucin	+	2	9	7
Thyrosin	1	3	11	13
Phenylalanin	1	1	6	3
Lysin	+	1	16	12
Histidin	1	8	8	7
Arginin	1	1	8	11

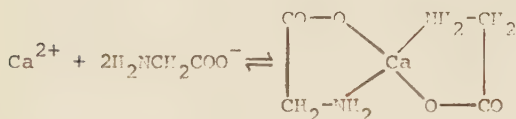
- = nicht nachweisbar

+ = $< 1 \mu\text{Mol/Liter}$

satz einer Aminosäure, beispielsweise Glycin, zur Lösung eines Calcium(II)-salzes eine Verminderung des pH-Wertes ein, dem folgendes Gleichgewicht zugrunde liegt:



Man kann die Reaktion auch als eine Verbindung des Metallions mit dem Anion des Chelatbildners auffassen, wodurch das Dissoziationsgleichgewicht der Aminosäure verschoben wird:



Das Ergebnis ist in beiden Fällen das gleiche. Man kann also qualitativ annehmen, daß die Chelatbildung von Metallen mit Aminosäuren einen pH-Abfall bewirkt. Das ist ein schnelles und einfaches Prüfverfahren für Chelat- oder Komplexbildung und es ist darüber hinaus auch für quantitative Messungen geeignet. Diese Methode ist bei jedem Chelat anwendbar, das in Wasser oder in solchen wasserhaltigen Lösungsmitteln löslich ist, die eine potentiometrische Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration zulassen.

4.3. Versuchsanordnung

Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin, Threonin, Prolin, Valin, Methionin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Arginin und Phenylalanin wurden in 0,1 n HCl gelöst und liegen bei Beginn der Versuche in Konzentrationen von 7,7 mmol/Liter vor. Sie wurden einmal

ohne Zusatz, zum anderen bei Anwesenheit von Calciumchlorid mit carbonatfreier 0,25 n KOH (Titrisol, Merck) titriert, wobei zunächst die Salzsäure zurücktitriert wurde. Wir haben deshalb KOH und nicht NaOH als Lauge eingesetzt, weil Natriumionen einen schwachen Komplex mit dem Chelatbildner geben (SCHWARZENBACH und Mitarb. ⁽³⁵⁾). Die Stabilitätskonstanten wurden also bei der angewendeten Methode im alkalischen Bereich bestimmt. Hydrolyseeffekte werden in allen Fällen vernachlässigt. Die Metallchlorid-Lösungen wurden aus $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) nach vorherigem Trocknen hergestellt und anschließend durch Titration mit Äthylendiamintetraessigsäure und Murexid standardisiert (SCHWARZENBACH ⁽²²⁾). Die Calcium-Konzentration betrug bei Titrationsbeginn 77 mmol/Liter. Calcium lag also im Überschuss vor. Die potentiometrischen Titrationsen wurden bei definierter Ionenstärke, und zwar bei einer Konzentration von 0,7 m KCl, ausgeführt. Das Titrationsvolumen betrug bei Beginn der Messungen 13 ml. Zur pH-Messung benutzten wir eine automatische Apparatur der Firma Radiometer, Copenhagen. Das Gerät besteht aus dem Titrator (Type TTT 1c), der ein gut stabilisiertes pH-Meter enthält, dem Titrigraph (Type SER 2c), einer geeichten Syringebürette (5 ml) und der Titrier-ausrüstung (Type TT A₃). Als Reaktionsgefäß diente ein zylindrisches doppelwandiges Gefäß, das an die Titrier-ausrüstung angeschlossen und mit einem Colora-Ultra-Thermostat (Type NB-DS) auf 25 °C bzw. 37 °C ($\pm 0,1^\circ$) gehalten wurde. Der Titrator wurde durch eine Glas-Kalomel-Elektroden-Kombination gesteuert. Die Meßkette haben wir mit Fixanalpuffern (Merck) geeicht und diese Eichung in gewissen Zeitabständen überprüft. Unter diesen Bedingungen lag die Reproduzierbarkeit unserer Messungen, unabhängig von der Meßtemperatur, bei 0,02 pH-Einheiten. In Abb. 4 sind die so erhaltenen Titrationskurven für eine Meßtemperatur von 25 °C dargestellt.

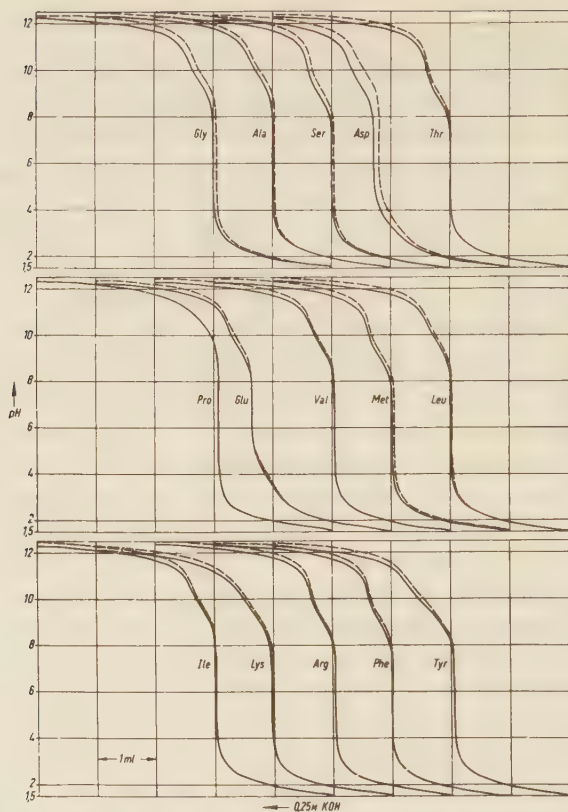


Abb. 4. Potentiometrische Titrationskurven zur Bestimmung der Calcium-Aminosäure-Chelate

Gestrichelte Kurven: Titration von 7,7 mM Aminosäure in 0,7 M KCl-Lösung.

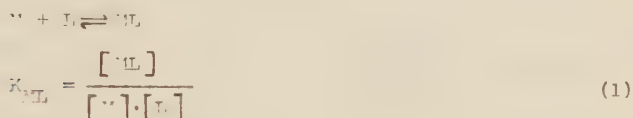
Ausgezogene Kurven: Titration von 7,7 mM Aminosäure und 7,7 mM CaCl_2 in 0,7 M KCl-Lösung.

Alle Messungen bei 25 °C.

Man erkennt, daß infolge der Komplexbildung eine verschieden starke pH-Erniedrigung auftritt.

4.3.1. Berechnung der Stabilitätskonstanten

Die Stabilitätskonstante eines Chelates ist die Gleichgewichtskonstante folgender Reaktion:



Dabei bedeuten:

L = nicht protonisierter Chelatbildner (alle dissoziierbaren H^+ -Ionen sind abgegeben)

M = Metallion

ML = Chelat

Die Säuredissoziationskonstanten für den Chelatbildner sind folgendermaßen zu formulieren:

$$K_{H_2L} = \frac{[H^+] \cdot [HL]}{[H_2L]} \quad (2)$$

$$K_{HL} = \frac{[H^+] \cdot [L]}{[HL]} \quad (3)$$

K_{HL} ist die Dissoziationskonstante des letzten abdissoziierbaren Protons.

Man kann den pK -Wert dieser letzten Säurestufe aus der Titrationskurve ermitteln. Er ist gleich dem pH -Wert bei Halbneutralisation. Gibt man zu dem Chelatbildner L ein Salz eines mehrwertigen Metallions M, so bildet sich in einer Gleichgewichtsreaktion das Chelat ML folgender

Gleichgewichtskonstante:

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} \quad (4)$$

Kombiniert man die Gleichungen (3) und (4), so erhält man

$$K_{HL} \cdot K_{ML} = \frac{[H^+] \cdot [ML]}{[HL] \cdot [M]} \quad (5)$$

Setzt man das Metallsalz im Überschuß zu, so ändert sich durch die Komplexbildung die Konzentration der Metallionen nur wenig, so daß man die Metallionen-Konzentration näherungsweise als konstant und gleich der Gesamtkonzentration des zugefügten Metallsalzes ansehen kann. Da K_{HL} aus der Titrationskurve der Aminosäure bekannt ist, und $[H^+]$ gemessen werden kann, läßt sich K_{ML} aus Gleichung (5) ermitteln, denn die Gleichgewichtskonzentrationen sind noch durch die bekannten Gesamtkonzentrationen miteinander verknüpft. Praktisch haben wir K_{ML} aus den Titrationskurven der Aminosäuren in Gegenwart eines $CaCl_2$ -Überschusses ermittelt.

Zur Auswertung einer solchen Kurve formt man Gleichung (5) um

$$K_{HL} \cdot K_{ML} \cdot [M] = \frac{[H^+] \cdot [ML]}{[HL]},$$

addiert Gleichung (3)

$$K_{HL} + K_{HL} \cdot K_{ML} \cdot [M] = \frac{[H^+] \cdot [ML]}{[HL]} + \frac{[H^+] \cdot [L]}{[HL]}$$

und erhält:

$$K_{HL} (1 + K_{ML} \cdot [M]) = \frac{[H^+] \cdot ([L] + [ML])}{[HL]} = K'_{HL} \quad (6)$$

K'_{HL} ist die Dissoziationskonstante der Säure in Gegenwart des Ca^{2+} -Überschusses.

Bei Halbneutralisation ist K'_{HL} gleich dem pH-Wert, denn hier ist $[L] + [ML] = [HL]$. Bei Halbneutralisation in Gegenwart des Calcium-Überschusses gilt also $pH = pK'_{HL}$. Nach Gleichung (6) ist K_{ML} für 1:1-Komplexe aus K_{HL} sowie K'_{HL} und $[M]$ aus der folgenden, von SCHWARZENBACH und Mitarb. (35,36) bei Halbneutralisation angegebenen Beziehung zu berechnen:

$$K_{ML} = \frac{\frac{K'_{HL}}{K_{HL}} - 1}{[M]} \quad (6a)$$

Es bedeuten:

K_{ML} = Stabilitätskonstante des Calcium-Aminosäure-Chelat-Komplexes

K'_{HL} = Dissoziationskonstante der Säure in Gegenwart des Calcium-Überschusses

K_{HL} = Dissoziationskonstante der Säure

$[M]$ = Metallionenkonzentration

Wegen der niedrigen Stabilitätskonstanten der Calcium-Aminosäure-Chelat-Komplexe konnten wir in der Gleichung (6a) -1 gegenüber K'_{HL}/K_{HL} nicht vernachlässigen, da der Kurvenverlauf sehr flach am Umschlagspunkt der Titrationskurven ist.

Logarithmieren von Gleichung (6a) ergibt, wenn $-lg [M]$ in Analogie zur Definition des pH-Wertes als pM bezeichnet wird:

$$lg K_{ML} = pK_{HL} - pK'_{HL} + pM \quad (6b)$$

Zur Untersuchung der Komplexbildung wurden die pH-Titrationskurven analysiert (SCHWAPZEMBACH und Mitarb. (18,19)). Die Wendepunktsbestimmung wurde so vorgenommen, daß für 25 Punkte jeder Kurve die Steigung $\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta V}$ bestimmt und gegen V (verbrauchte Volumina an KOH) aufgetragen wurde. Die so erhaltenen $\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta V}$ -V-Kurven zeigten dann am Äquivalenzpunkt ein Maximum. Nach Bestimmung des Halbneutralisationspunktes setzten wir den an dieser Stelle gemessenen Wert von ΔpH für $\text{pK}_{\text{IHL}} - \text{pK}'_{\text{HL}}$ in Gleichung (6b) ein und erhielten, da pM bekannt war, $\lg K_{\text{HL}}$.

Die mit dem beschriebenen Rechenverfahren ermittelten Stabilitätskonstanten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die von DAVIES und WAIND⁽³³⁾ und LUMB und MARTELL⁽³⁴⁾ gemessenen Werte von Glycin, Alanin, Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure mit unseren Meßwerten übereinstimmen. Den von DAVIES und WAIND⁽³³⁾ angegebenen Wert von Tyrosin konnten wir allerdings nicht bestätigen.

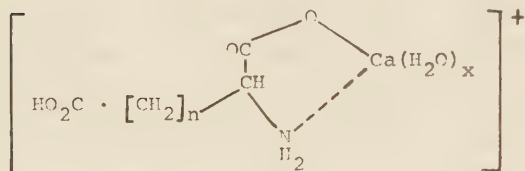
Ein Vergleich der Stabilitätskonstanten, die bei 25 °C und bei 37 °C gemessen wurden, zeigt keine wesentlichen Unterschiede der Zahlenwerte. Die Konstanten sind bei 37 °C etwas kleiner. Für Prolin ist die Stabilitätskonstante bei beiden Temperaturen praktisch gleich Null. Aus dem dazugehörigen Diagramm in Abb. 4 sieht man, daß hier keine pH-Erniedrigung am Umschlagspunkt vorhanden ist, also auch praktisch keine Komplexbildung eintritt. Im ganzen gesehen sind die Stabilitätskonstanten der Calcium-Aminosäure-Chelat-Komplexe sehr niedrig. Die Logarithmen der Stabilitätskonstanten sind für Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Alanin und Glycin alle größer als 1.

Für die übrigen eingesetzten Aminosäuren, nämlich Threonin, Valin, Methionin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Arginin, Phenylalanin und Tyrosin, liegen die gemessenen Werte darunter bzw. sind praktisch Null für Prolin. Die relativ

Tab. 2. Stabilitätskonstanten der 1:1-Calcium-Chelat-Komplexe von Aminosäuren

Ligand	$\lg K_{ML} (25^{\circ}C)$	Literaturwerte $\lg K_{ML} (25^{\circ}C)$	$\lg K_{ML} (37^{\circ}C)$
Glycin	1,41	1,43 sol ⁽³³⁾	1,19
Alanin	1,19	1,24 sol ⁽³³⁾	1,19
Serin	1,35	1,43 sol ⁽³³⁾	1,29
Asparaginsäure	1,53	1,60 gl ⁽³⁴⁾	1,53
Threonin	1,07		1,07
Prolin	0		0
Glutaminsäure	1,20	1,43 gl ⁽³⁴⁾	1,19
Valin	0,82		0,82
Methionin	0,96		0,96
Leucin	0,90		0,82
Isoleucin	0,90		0,65
Lysin	0,72		0,72
Arginin	0,61		0,61
Phenylalanin	0,87		0,87
Tyrosin	1,02	1,48 sol ⁽³³⁾	1,02
sol = Löslichkeit gl = Glaselektrode			

hohen Stabilitätskonstanten für Asparaginsäure und Glutaminsäure sind nach LUMB und MARTELL⁽³⁴⁾ auf die bei diesen Aminosäuren vorhandene zweite Carboxyl-Gruppe zurückzuführen. Analog zu dem Calcium-Glycin-Chelat-Komplex (DAVIES und WAIND⁽³³⁾) wird für Asparagin-(I) und Glutaminsäure-Komplexe (II) mit Calcium die folgende Struktur angenommen (LUMB und MARTELL⁽³⁴⁾):



I : n = 1, II : n = 2

Obgleich dabei die zweite Carboxyl-Gruppe nicht in die Metallchelatformung eingeschlossen ist, wird angenommen, daß sie einen indirekten Einfluß auf die Stabilität des Chelatringes hat. Die geringere Stabilität des Calcium-Glutaminsäure-Chelates gegenüber dem Calcium-Asparaginsäure-Chelat ist wahrscheinlich auf einen schwächeren induktiven Effekt der negativen Carboxyl-Gruppe bei II zurückzuführen.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1. Berechnung der als Aminosäure-Chelate lösbaren Zahnhartsubstanz

Wir errechneten mit den von uns gefundenen Stabilitätskonstanten der Calcium-Aminosäure-Chelat-Komplexe und der Calciumionen-Konzentration die mit Calcium zum 1:1-

Chelat ML reagierenden Anteile der Aminosäuren L im Speichel nach der Näherungsformel (CHABEREK und MARTELL (37)):

$$[ML] = \frac{[M] \cdot K_{ML} \cdot K_{HL} \cdot [L]}{K_{HL} + [H^+]} \quad (7)$$

Die von uns gefundenen Werte der Calciumionen-Aktivität (vgl. Kap. 3.1.) können nach Kap. 2.2.3. näherungsweise der Calciumionen-Konzentration gleichgesetzt werden.

Es bedeuten:

- $[M]$ = Calciumionen-Konzentration [Mol/Liter]
- $[H^+]$ = H^+ -Ionenkonzentration [Mol/Liter]
- K_{ML} = Stabilitätskonstante der 1:1-Calcium-Aminosäure-Chelate [Mol/Liter]
- K_{HL} = Dissoziationskonstante der Aminosäuren [Mol/Liter]
- $[L]$ = Konzentration der freien einbasischen Aminosäuren im Speichel [Mol/Liter]

Um zu vereinfachen, setzten wir die Summe der Konzentrationen aller im Speichel nachgewiesenen Aminosäuren als $[L] = 1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter in die Formel (7) ein. Für K_{HL} setzten wir $1 \cdot 10^{-10}$ Mol/Liter ein. Die H^+ -Konzentration im Speichel, der ein Bicarbonat-Puffersystem darstellt, geben wir aufgrund unserer Messungen (vgl. Kap. 2) an 160 Versuchspersonen mit einem Durchschnittswert von $1 \cdot 10^{-7}$ Mol/Liter an. Die Calciumionen-Konzentration $[M]$, die sich infolge der Löslichkeit des Hydroxylapatits in Wasser einstellt, beträgt bei einer Wasserstoffionen-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ Mol/Liter $\approx 2 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter und steht im Gleichgewicht mit der Calciumionen-Konzentration im Speichel von ebenfalls $\approx 2 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter bei einer Wasserstoffionen-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ Mol/Liter (vgl. Abb. 3). Als durchschnittliche Stabilitätskonstante der Calcium-Aminosäure-Chelate verwenden wir einen oberen Grenzwert von $1 \cdot 10^2$ Mol/Liter, der nach

unseren Messungen (HARDEL⁽²³⁾) bei 15 Aminosäuren nicht überschritten wird.

Mit

$$\begin{aligned} [L] &\cong 1 \cdot 10^{-4} \text{ [Mol/Liter]} \\ F_{ML} &\cong 1 \cdot 10^{-10} \text{ [Mol/Liter]} \\ [H^+] &\cong 1 \cdot 10^{-7} \text{ [Mol/Liter]} \\ [M] &\cong 2 \cdot 10^{-4} \text{ [Mol/Liter]} \\ K_{ML} &\cong 1 \cdot 10^2 \text{ [Mol/Liter]} \end{aligned}$$

erhalten wir durch Einsetzen dieser Zahlenwerte in Gleichung (7)

$$[ML] = \frac{2 \cdot 10^{-4} \cdot 1 \cdot 10^2 \cdot 1 \cdot 10^{-10} \cdot 1 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-10} + 1 \cdot 10^{-7}} = 2 \cdot 10^{-9} \text{ [Mol/Liter]} \quad (7a)$$

Diese Konzentration ist gleich der durch die Chelatbildung aus dem Apatit des Zahnschmelzes zusätzlich gelösten Calcium-Konzentration.

Da die Calciumionen-Aktivität des Speichels ($a = f_c$) dem Löslichkeitsgleichgewicht des Zahnminerals (ca. $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Calcium/Liter) entspricht (vgl. Abb. 3), bedeutet Gleichung (7a), daß zusätzlich zu diesen, im Löslichkeitsgleichgewicht mit dem Zahnmineral stehenden $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Calcium/Liter (= 8 mg Ca^{2+} /Liter) nur noch $2 \cdot 10^{-9}$ Mol Calcium/Liter (= 0,08 µg Calcium/Liter) als Aminosäure-Chelat aus der Zahnhartsubstanz gelöst werden. 0,08 µg Calcium/Liter entsprechen einer Löslichkeit von 0,2 µg Zahnmineral im Liter, wenn man für das Zahnmineral näherungsweise die Formel $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ zugrundelegt.

Bei einer täglichen Speichelmenge von 1,5 Liter können somit innerhalb von 100 Jahren nur 4 mg Calcium $\cong$ 10 mg Zahnhartsubstanz durch die Calcium-Aminosäure-Chelatbildung gelöst werden.

Nach einer Überschlagsrechnung reichen die aus der bei der Caries auftretenden Proteolyse der Zahnmatrix stammenden Aminosäuren ebenfalls nicht aus, um das Auflösen des Zahnminerals im cariösen Herd zu erklären.

Es ließe sich einwenden, daß wir die Calciumchelate der Aminosäuren in ihrer Summe betrachten und die Rechnung nicht auf einzelne Aminosäuren bezogen haben. Die Einzelrechnung ist durchführbar, aber in ihrer biologischen Anwendung wenig sinnvoll, weil die von uns eingesetzte Stabilitätskonstante bereits einen maximal gemessenen Wert darstellt, weil die Konzentration einer einzelnen Aminosäure im Speichel des Gesunden von $1 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter nicht überschritten wird und weil Konzentrationsanstiege einzelner freier Aminosäuren im Speichel des Carieskranken um mehrere Zehnerpotenzen bisher nicht bekannt sind.

Unsere Berechnungen machen die Hypothese von SCHATZ⁽³⁻⁹⁾, daß Aminosäuren als Chelatbildner für Calcium bei der Entwicklung einer Zahncaries eine Rolle spielen, hinfällig. Sie unterstützen die aufgrund der Löslichkeitsversuche geäußerten Vermutungen von BEFUSTEDT⁽²⁹⁾. Es läßt sich nach Gleichung (7) abschätzen, daß die "Proteolyse-Chelatbildungs-Hypothese" der Caries nur aufrechterhalten werden kann, wenn biologische Chelatbildner für Calcium gefunden werden, die vor allem eine hohe Stabilitätskonstante haben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Hypothesen zur Frage der Cariesgenese, nämlich die chemisch-parasitäre Hypothese von MILLER und die Proteolyse-Chelatbildungs-Hypothese von SCHATZ, dürfen aufgrund unserer Versuchsergebnisse nicht aufrecht zu erhalten sein.

Es ergab sich:

1. Aus Löslichkeitsuntersuchungen von Hydroxylapatit und Calcium-Aktivitätsbestimmungen im Speichel folgt, daß ein quasistationäres Gleichgewicht zwischen dem Apatit des Zahnschmelzes und dem Speichel besteht.
2. Mit zunehmender Wasserstoffionen-Aktivität steigt zwar die Löslichkeit der anorganischen Komponenten des Zahnschmelzes. Aber gleichzeitig nimmt der prozentuale Anteil des ionisierten Calciums zu, weil die Komplexbildung des Calciums mit abnehmendem pH-Wert vermindert wird. Es kompensieren sich bei Änderung des pH Auflösung und Abscheidung der Zahnhartsubstanz.
3. Durch Messung der Stabilitätskonstanten von 15 im menschlichen Speichel vorkommenden Aminosäuren und Berechnung der als Aminosäure-Chelate löslichen Zahnhartsubstanz ergab sich, daß sich praktisch kein Calcium durch Chelatbildung mit Aminosäuren, die aus dem Speichel und der Proteolyse der Zahnhartsubstanz stammen, lösen kann.

Nach den hier aufgeführten Ergebnissen erscheint es nicht länger haltbar, ausschließlich die Löslichkeit der Zahnhartsubstanz zu diskutieren. Es muß vielmehr neben dieser Löslichkeit der Zahnhartsubstanz der diese Löslichkeit kompensierende Einfluß des Speichels in Betracht gezogen werden. Die Verhältnisse können vereinfachend durch folgendes Bild beschrieben werden:

Säuren, die auf Zahnschmelz einwirken und deren Komplexbildung mit Calcium klein ist, lösen zwar Calciumionen aus dem Zahnschmelz, gleichzeitig aber wird aus den Calcium-Komplexen des Speichels eine äquivalente Menge an Calciumionen freigesetzt und abgeschieden.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) MILLER, W.D. Über die Caries der Zähne.
Korresp.bl. Zahnärzte, Berlin
13, 89 (1884)
- 2.) MILLER, W.D. Die Mikroorganismen der Mundhöhle,
Georg Thieme-Verlag, Leipzig 1892
- 3.) MARTIN, J.J., ISENBERG, H.D., SCHATZ, V., TRELAHNY, G.S.
und A. SCHATZ Chelation or metalbinding as a new
approach to the problem of dental caries.
Euclides 14, 311 (1954)
- 4.) SCHATZ, A. und J.J. MARTIN
The proteolysis-chelation theory of den-
tal caries.
J. Amer. Dent. Ass. 65, 368 (1962)
- 5.) MARTIN, J.J., SCHATZ, A. und K.E. KARLSON
Proteolysis-chelation: A new theory of
dental caries.
J.N. Jersey Dent. Soc. 27, 7 (1955)
- 6.) SCHATZ, A., KARLSON, K.E. und J.J. MARTIN
Destruction of tooth organic matter by
oral keratinolytic microorganisms.
N.Y. State Dent. J. 21, 438 (1955)
- 7.) SCHATZ, A. und J.J. MARTIN
Opportunities for creative research in
dental caries.
N.Y. J. Dent. 29, 5 und 29, 47 (1959)
- 8.) SCHATZ, A. Some recent developments in caries re-
search.
N.Y. State Dent. J. 28, 119 (1962)

- 9.) SCHATZ, A., MARTIN, J.J. und K.E. KARLSON
Abbau von organischen Schmelzbestand-
teilen und keratinösem Eiweiß durch
proteolytische Bakterien der Mundhöhle.
Zahnärztl. Rdsch., Berlin 65, 349 (1956)
- 10.) LEVINSKAS, G.J. und W.F. NEUMAN
The solubility of bone mineral I.
Solubility studies of synthetic hydroxyl-
apatite.
J. phys. Chem. 59, 164 (1955)
- 11.) ERICSSON, Y. Enamel-apatite solubility,
Acta Odont. Scand. Vol. 8, Suppl. 3 (1949)
- 12.) WANDELT, S. Eiweißabbauprodukte als Chelatoren und
ihre möglichen Beziehungen zur Caries.
Dtsch. Zahnärztl. Zschr. 15, 376 (1960)
- 13.) EGGERS-LURA, H. Die Metallchelatierung und ihre Bedeu-
tung für die künftige Cariesforschung.
Dtsch. Zahnärztl. Zschr. 11, 543 (1956)
- 14.) DULCE, H.-J. und M. HARDEL
Calciumionen-Aktivität im Löslichkeits-
gleichgewicht zwischen dem Apatit des
Zahnschmelzes und dem Speichel.
Naturwissenschaften 3, 137 (1968)
- 15.) GOMORI, G. Methods in Enzymology, Vol. I,
Acad. Press, New York 1955, S. 142
- 16.) PLUMEL, M. Sodium cacodylat buffer solutions.
Bull. Soc. Chim. Biol., Paris
30, 129 (1948)
- 17.) GOMORI, G. Methods in Enzymology, Vol. I,
Acad. Press, New York 1955, S. 144

- 18.) SCHWARZENBACH, G. und H. ACKERMANN
Komplexone XII.
Die Homologen der Äthylendiamin-tetra-
essigsäure und ihre Erdalkalikomplexe.
Helv. chim. Acta 31, 1029 (1948)
- 19.) SCHWARZENBACH, G., WILLY, A. und R.O. BACH
Komplexone IV.
Die Acidität und die Erdalkalikomplexe
der Anilin-diessigsäure und ihrer Sub-
stitutionsprodukte.
Helv. chim. Acta 30, 1303 (1947)
- 20.) SCHWARZENBACH, G., BIEDERMANN, W. und F. BANGERTER,
Komplexone VI.
Neue einfache Titriermethoden zur Be-
stimmung der Wasserhärte.
Helv. Chim. Acta 29, 811 (1946)
- 21.) QUICKER, R. und H.-J. DULCE
Photometrische Mikromethode für die
komplexometrische Titration von Calcium.
Zschr. klin. Chem. u. klin. Biochem.
3, 176 (1968)
- 22.) SCHWARZENBACH, G.
Die komplexometrische Titration,
F. Enke, Stuttgart 1956
- 23.) HARDEL, M.
Stabilitätskonstanten von Calcium-Ami-
nosäure-Chelatkomplexen.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.
346, 224 (1966)
- 24.) HARDEL, M. und H.-J. DULCE
Berechnung der als Aminosäure-Chelate
lösbaren Zahnhartsubstanz.
Dtsch. Zahnärztl. Zschr. 20, 693 (1965)

- 25.) MARTELL, A.E. und M. CALVIN
Die Chemie der Metallchelateverbindungen,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1958
- 26.) MORGAN, G.T. und H.D.K. DREW
Researches on residual affinity and coordination.
Part II. Acetylacetones of selenium and tellurium.
J. chem. Soc. 117, 1456 (1920)
- 27.) FEIGL, F. Chemistry of specific, selective and sensitive reactions,
Acad. Press, New York 1949, S. 412
- 28.) SCHATZ, A. und J.J. MARTIN
Destruction of bone and tooth by proteolysis-chelation: its inhibition by fluoride and application to dental caries.
N.Y. J. Dent. 30, 124 (1960)
- 29.) BREUSTEDT, A. Untersuchungen über die komplexbildenden Eigenschaften von Calcium.
Dtsch. Zahnärztl. Zschr. 16, 883 (1961)
- 30.) EGGERS-LURA, H. Neue Perspektiven und Richtlinien in der biochemischen Cariesforschung.
Dtsch. Zahnärztl. Zschr. 19, 133 (1964)
- 31.) MOORE, S., SPACKMAN, D.H. und W.S. STEIN
Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins.
Analyt. Chem. 30, 1185 (1958)
- 32.) DORNER, K. Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren im Speichel.
Dtsch. Zahnärztl. Zschr. 20, 664 (1965)

33.) DAVIES, C.W. und G.M. WAIND

The extent of dissociation of salts in water

Part XII. Calcium salts of some amino-acids and dipeptides.

J. chem. Soc. (London) Part I, 301 (1950)

34.) LUMB, R.F. und A.E. MARTELL

Metal chelating tendencies of glutamic and aspartic acids.

J. phys. Chem. 57, 690 (1953)

35.) SCHWARZENBACH, G. und H. ACKERMANN

Komplexone V.

Die Äthyldiamin-tetraessigsäure.

Helv. chim. Acta 30, 1798 (1947)

36.) SCHWARZENBACH, G., KAMPITSCH, E. und R. STEINER

Komplexone I.

Über die Salzbildung der Nitrilotriessigsäure.

Helv. chim. Acta 28, 828 (1945)

37.) CHABEREK, S. und A.E. MARTELL

Organic sequestering agents,

John Wiley and Sons, New York 1959

Herrn Prof. Dr. H.-J. D u l c e bin ich für die
Anregung zu dieser Arbeit und für die ständige Un-
terstützung zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

16. 2. 1936 geboren in Markkleeberg
- 1954 Abitur in Leipzig
- 1954 - 1959 Studium an der Universität Postock
- 1956 Humanmedizinisches Physikum
- 1957 Zahnmedizinisches Physikum
- 1959 Zahnmedizinisches Staatsexamen
- 1959 - 1964 Tätigkeit als Zahnärztin
- 1963 Promotion an der Freien Universität Berlin
zum Dr. med. dent. über das Thema:
"Untersuchungen über den Einfluß von Redox-
katalysatoren auf das Wachstum von Mäuse-
asciteskrebszellen".
- 1964 - 1969 Studium an der Freien Universität Berlin
- 1969 Medizinisches Staatsexamen
- 1969 - 1970 Medizinalassistentin
- 1970 Wissenschaftliche Assistentin am Institut
für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
des Klinikums Steglitz der Freien Universi-
tät Berlin.

